



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 38 967 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶: **AE**
C 07 K 14/435

⑳ Aktenzeichen: 198 38 967.1
㉔ Anmeldetag: 6. 2. 98
㉕ Offenlegungstag: 12. 8. 99

DE 198 38 967 A 1

㉑ **Anmelder:**
Abken, Hinrich, Univ.-Prof. Dr.med., 56414 Meudt,
DE

㉒ **Vertreter:**
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner, 50667
Köln

㉓ **Erfinder:**
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Hemmung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung CD30 Antigen exprimierender Zellen

DE 198 38 967 A 1

BEST AVAILABLE COPY

5 Generierung des CD30 bindenden Moleküls SEQ ID NO 1 und Nachweis von CD30⁺ Tumor-Zellen mit Hilfe des Moleküls SEQ ID NO 1.

Die Generierung des rekombinanten monovalenten CD30 Antigen bindenden Moleküls SEQ ID NO 1 erfolgte mit Hilfe der Phage display Technik (McCafferty et al., Nature 348: 552-554, 1990; Winter und Milstein, Nature 349: 293-299, 1991) ausgehend von einem anti-CD30 Antikörper exprimierenden Hybridom-Klon. Die variablen (V)-Regionen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Kette eines Antikörpers werden zu einem Einzel-Ketten-Molekül verknüpft (V_H-V_L), wodurch eine monovalente Bindungsstelle für das CD30 Antigen generiert wird.

Aus den Hybridom-Zellen HRS3 (Pfreundschuh et al., Leukocyte Typing, vol. 4, Oxford University Press, pp. 419-422, 1989) wurde polyA+mRNS nach dem Fachmann bekannten Verfahren gewonnen (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 8.11-8.13, 1989). Die mRNS wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Als Startermoleküle diente ein Gemisch aus Hexadesoxyribonukleotiden ("primed first-strand reaction mix" Pharmacia Biotech, Freiburg, Cat. No. 27-9400-01). Mit Hilfe der PCR wurde die cDNS der variablen Region der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) der Antikörper unter Verwendung Immunglobulin-spezifischer Oligonukleotide ("heavy primer 1", "heavy primer 2", "light primer mix", Pharmacia, Cat.Nr. 27-1583-01; 27-1586-01) amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde die V_H- (ca. 340 bp) und V_L-cDNS (ca. 325 bp) mit Hilfe einer Verbindungssequenz, kodierend für ein (Gly4Ser)3-Peptid (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988), zu einem Molekül verbunden. Diese Verbindungs-DNS ist so beschaffen, daß sie mit einem Ende mit dem 3'-Ende der V_H-cDNS und mit dem anderen Ende mit dem 5'-Ende der V_L-cDNS hybridisiert ("linker-primer-mix", Pharmacia, Cat.Nr. 27-1588-01). Nach Hybridisierung wurde das V_H-linker-V_L Fragment (scFv) (ca. 750 bp) reamplifiziert, wobei Oligonucleotide ("RS-primer-mix", Pharmacia, Cat.No. 27-1589-01) benutzt wurden, welche die Enden der PCR Produkte mit flankierenden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sfi I (5' V_H-Ende) und Not I (3' V_L-Ende) ausstatten. Nach Spaltung dieser Restriktionsstellen erlauben die so generierten DNS-Enden eine gerichtete Integration in die Sfi I/Not I linearisierte pCANTAB 5E Phagemid DNS (Pharmacia, Cat.Nr. 29-9401-01). Das scFv-Fragment wird in diesem Phagemid als Fusionsprotein mit dem Phagen Protein gp3 auf der Phagenoberfläche exprimiert.

30 Zur Produktion der Phagen mit dem CD30-bindenden Molekül wurden TGI E.coli Bakterien mit der rekombinanten Phagemid-DNS transformiert und anschließend mit M13KO7 Helferphagen infiziert. Unter Verwendung des anti-idiotypischen Antikörpers 9G10 (Pohl et al., Int. J. Cancer 50: 958-967, 1992) wurden mit Hilfe der Panning-Technik nach dem Fachmann bekannten Verfahren (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988) selektiv die Phagen angereichert, die das CD30 Antigen zu binden vermögen. Mit diesen Phagen wurden TGI E.coli Bakterien infiziert und die Phagen amplifiziert. Die erhaltene CD30 Antigen bindende, rekombinante Domäne mit einer Bindungsvalenz hat die in SEQ ID NO 1 gezeigte cDNS und abgeleitete Aminosäure Sequenz.

Zum Nachweis von CD30 exprimierenden Tumorzellen mit Hilfe des rekombinanten CD30-bindenden Molekül SEQ ID NO 1 wurden L540 Zellen (CD30⁺ Hodgkin Lymphom-Zellen) (Diehl et al., Cancer Treatment Reports 66: 615-632, 1982) und BL60 Zellen (CD30⁻ Burkitt Lymphom-Zellen) (Lenoir et al., in: Pathogenesis of leukemias and lymphomas: environmental influences. Hrg: Magrath, O'Connor, Ramot. Raven Press, New York, 283 pp., 1984) mit dem CD30-bindenden Phagen (M13-SEQ ID NO 1) inkubiert. Als Kontrollen dienten Inkubationen mit dem "leeren" Phagen M13 ohne Insertion sowie mit einem rekombinanten Phagen M13-scFv-B72.3, der eine Bindungsdomäne spezifisch für das TAG72 Antigen trägt (Hombach et al., Gastroenterology 113, 163, 170, 1997). Die Zellen wurden gewaschen und anschließend mit einem Schafanti-M13 Antikörper (Pharmacia Biotech, Cat.Nr. 27-9411-01) inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Kaninchen anti-Schaf Immunglobulin Antikörpers (Immunotech) und mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zell-Analyse (FACS).

Ergebnis

50 Phagen mit der Bindungsdomäne SEQ ID NO 1 binden spezifisch L540 Zellen (CD30⁺), jedoch nicht BL60 Zellen (CD30⁻) (Abb. 1). Inkubationen der Zellen mit dem "leeren" Kontrollphagen M13, der kein CD30 bindendes Molekül enthalten, sowie mit dem TAG72-bindenden Phagen M13-scFv-B72.3 zeigen keine spezifische Bindung an CD30⁺ Zellen. Daraus schließen wir, daß das Molekül SEQ ID NO 1 eine spezifische Bindung an CD30⁺ Zellen vermittelt und zur Identifizierung dieser Zellen geeignet ist.

Beispiel 2

Hemmung der Proliferation von CD30⁺ Tumor-Zellen mit Hilfe der rekombinanten monovalenten CD30 Antigen bindenden Domäne SEQ ID NO 1.

60 Aus dem rekombinanten Phagen M13-SEQ ID NO 1 (aus Beispiel 1) wurde die lösliche SEQ ID NO 1 Domäne nach folgendem Verfahren präpariert (analog zu Pharmacia Biotech, Cat.Nr. 27-9401-01). E.coli HB2151 Bakterien wurden mit M13-SEQ ID NO 1 infiziert, Bakterien-Kolonien isoliert und zur Induktion der Produktion löslicher SEQ ID NO 1 Antikörper in Glukose-freiem Medium kultiviert. Der lösliche SEQ ID NO 1 Antikörper wurde aus dem Überstand und dem Periplasma der Bakterien durch Affinitätsbindung an den idiotypischen Antikörper 9G10 angereichert (Pohl et al., Int. J. Cancer 50: 958-967, 1992).

65 L428 Hodgkin's Lymphomzellen (CD30⁺) und BL60 Burkitt's Lymphom-Zellen (CD30⁻) wurden zu 10³ Zellen in 100 µl Kulturmedium (RPMI 1640 Medium, 10% foetales Kälberserum) pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Den Zellen wurden das Polypeptid SEQ ID NO 1 und als Kontrolle des Polypeptid scFv-B72.3, das Bindungsspe-

zifität für das TAG72 Antigen aufweist, jeweils in den Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml hinzugegeben. Als weitere Kontrolle diente eine "Schein"-Inkubation der Zellen ohne Polypeptid. Am Tag 6 der Inkubation wurde jeweils die Zellvitalität mit Hilfe des "XTT-Tests" (Boehringer Mannheim, Cat.Nr. 1465015) gemessen. Dieser Test beruht darauf, daß das Tetrazolium-Salz XTT zu Formazan durch das Succinat-Tetrazolium Reduktase Enzymsystem gespalten wird, das Teil der Atmungskette der Mitochondrien ist und nur in lebenden Zellen aktiv ist. Die Menge des gebildeten Formazans korreliert mit der Anzahl lebender Zellen in der Meßprobe.

Ergebnis

Die L540 Lymphom-Zellen (CD30⁺) stellen in Gegenwart des Polypeptids SEQ ID NO 1 ihre Proliferation ein, nicht jedoch in Gegenwart des scFv-B72.3 Polypeptids. Die BL60 Lymphom-Zellen (CD30⁻) proliferieren sowohl in Gegenwart des SEQ ID NO 1 als auch des scFv-B72.3 Polypeptids (Tabelle 1). Wir schließen daraus, daß die rekombinante und monovalente Domäne SEQ ID NO 1 mit Bindungsspezifität für das CD30 Antigen die Proliferation von CD30⁺ Lymphom-Zellen zu hemmen und den Zelltod einzuleiten vermag.

Tabelle 1

XTT-Metabolisierung von L540 (CD30⁺) und BL60 (CD30⁻) Zellen in Gegenwart von anti-CD30 SEQ ID NO1 Polypeptid

| Zellen | | Inkubation mit SEQ ID NO 1 | | scFv-B72.3 | |
|--------|------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|
| | | [1µg/ml] | [10µg/ml] | [1µg/ml] | [10µg/ml] |
| L540 | 0,92 | 0,74 | 0,38 | 0,98 | 0,87 |
| BL60 | 1,14 | 1,06 | 1,11 | 1,09 | 1,02 |

Die Zellen (10³ Zellen in 100 µl Medium) wurden ohne Polypeptid [-] oder in Gegenwart des anti-CD30 Polypeptids SEQ ID NO 1 oder des anti-TAG72 Polypeptids scFv-B72.3 inkubiert und die XTT Metabolisierung am Tag 6 gemessen. Angegeben ist die Absorption A495 nm – A690 nm.

Beispiel 3

Hemmung der Proliferation von CD30⁺ Tumor-Zellen mit Hilfe der CD30 Antigen bindenden Domäne SEQ ID NO 1, die mit einer zellaktivierenden Signalkette gekoppelt ist.

Die CD30-Antigen bindende Domäne SEQ ID NO1 aus Beispiel 1 wurde mit Hilfe der PCR Reaktion unter Verwendung der Starter-Oligonukleotide 5'-GCGGCCAGTCTAGAAATGGCCAG-3' und 5'-GGTTCACGCGGATCCGGA-TACGGC-3' amplifiziert. Dadurch werden 5' eine XbaI- und 3' eine BamHI-Spaltstelle in das PCR-Produkt eingeführt. Nach Spaltung mit XbaI und BamHI wurde das PCR-Produkt in die XbaI und BamHI Stelle des Expressionsplasmids pRSVscFvRy (Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 720-724, 1993) inseriert. Der Expressionsvektor leitet sich von dem Plasmid pRSV2neo ab und verfügt über eine RSV LTR gesteuerte Expressionskassette, die die leader-Sequenz der SC15k-Immunglobulin-Leichtkette sowie die cDNA Sequenz der transmembranen und zytoplasmatischen Domäne der signalleitenden γ-Untereinheit des humanen FcεRI Rezeptors enthält. Die in dem Vektor enthaltene DNA für das anti-TNP scFv-Fragment Sp6-scFv wird deletiert und durch die DNA der SEQ ID NO 1 ersetzt. Die Expressionskassette kodiert nunmehr für ein Fusionsprotein bestehend aus der monovalenten CD30 bindenden Domäne SEQ ID NO 1 und dem transmembranen und zytoplasmatischen Anteil der γ-Kette des FcεRI Rezeptors.

Die DNA wurde mit Hilfe der Elektroporation (ein Puls, 250 V, 2,4 mF, Elektroporator EasyJect, Stratagene, Heidelberg) in MD45 T-Zellen (Kaufmann et al., Transplant. Proc. 13: 1170-1174, 1981) übertragen. In Gegenwart von G418 (2 mg/ml) wurden transfizierte Zell-Klone (F8 und C1) isoliert, die den CD30-bindenden Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Die Zellklone wurden hinsichtlich ihrer Aktivität, CD30⁺ Lymphomzellen spezifisch zu erkennen und in ihrem Wachstum zu supprimieren, geprüft.

F8 und C1 Zellen sowie als Kontrolle nicht-transfizierte MD45 Zellen wurden 48 Stunden mit Glutaraldehyd-fixierten L540 Zellen kokultiviert. Vitale L540 Zellen (CD30⁺) sowie BL60-Lymphom-Zellen (CD30⁻) wurden mit Europium-DPTA nach bekanntem Verfahren (Blomberg und Ulfstedt, J. Immunol. Meth. 160: 27-34, 1993) markiert und anschließend mit den vorstimulierten F8, C1 und MD45 Zellen in unterschiedlichen Zahlenverhältnissen (5 : 1; 2,5 : 1; 1 : 1; 0,5 : 1) (Effektorzellen : Zielzellen) gemischt. Nach 6 Stunden Inkubation wurde die Europium-Konzentration im Kulturüberstand mittels zeitdifferenzierter Fluorometrie bestimmt. Die spezifische Zell-Lyse wurde ermittelt nach

$$X = [A-C]/[B-C]$$

für X = spezifische Europium-Freisetzung [%], A = ermittelte Europium-Freisetzung [cpm], B = maximale Europium-Freisetzung nach Zugabe von 1% (v/v) Nonidet P-40, C = spontane Europium-Freisetzung [cpm].

Ergebnis

L540 Lymphom-Zellen (CD30⁺) werden in Abhängigkeit von dem Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen lysiert (Abb. 2A), während BL60 Lymphom-Zellen (CD30⁻) nicht lysiert werden (Abb. 2B). Nichttransfizierte MD45 Zellen induzieren keine Zell-Lyse der Lymphom-Zellen. Wir schließen aus diesem Experiment, daß die CD30 bindende Domäne SEQ ID NO1 als Fusionsprotein mit der γ -Kette des Fc ϵ RI Rezeptors eine spezifische Zytolyse durch zytotoxische T-Zellen zu vermitteln vermag. Die Zytolyse ist spezifisch, da ausschließlich CD30⁺ Zellen, nicht aber CD30⁻ Zellen lysiert werden.

Beispiel 4

Hemmung der Proliferation von CD30⁺ Tumor-Zellen mit Hilfe von CD30 RNS bindenden Oligonukleotiden.

Das CD30 Antigen wird von einer 3,6 kb großen RNS kodiert (Dürkop et al., Cell 68, 421-427, 1992). Die cDNA Sequenz ist in der EMBL GenBank unter acc. no. M83554 hinterlegt. Wir leiteten die DNA-Sequenz für zwei Oligonukleotide (anti-sense 1, anti-sense 2) ab, die an die CD30 RNS an den Positionen 217-233 und 272-286 hybridisieren, sowie ein Kontroll-Oligonukleotid (sense 1) in sense-Orientierung und ein Oligonukleotid (non-sense 1) mit denselben Basen in zufälliger Reihenfolge.

Sequenzen der Oligonukleotide

anti-sense Oligonukleotid 1: 5'GACGCGCATCCCCGG3'
 anti-sense Oligonukleotid 2: 5'CCTGTGGGAAGGCTC3'
 sense Oligonukleotid 1: 5'CCGGGGATGCGCGTC3'
 non-sense Oligonukleotid 1: 5'A₂T₁G₅C₇3'

L428 Hodgkin Lymphomzellen (CD30⁺) und BL60 Burkitt Lymphom-Zellen (CD30⁻) wurden in Verdünnungen zu je 10³ und 5 × 10² Zellen in 100 µl Kulturmedium (RPMI 1640 Medium, 10% foetales Kälberserum) pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Den Zellen wurden jeweils die Oligonukleotide (anti-sense Oligonukleotid 1, anti-sense Oligonukleotid 2, sense Oligonukleotid 1, non-sense Oligonukleotid 1) jeweils in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM, 40 µM hinzugegeben. Als weitere Kontrolle diente eine "Schein"-Inkubation der Zellen ohne Oligonukleotid. Am Tag 5 der Inkubation wurde jeweils die Zellvitalität mit Hilfe des "XTT-Tests" (Boehringer Mannheim, Cat.Nr. 1465015) gemessen. Dieser Test beruht darauf, daß das Tetrazolium-Salz XTT zu Formazan durch das Succinat-Tetrazolium Reduktase Enzymsystem gespalten wird, das Teil der Atmungskette der Mitochondrien ist und nur in lebenden Zellen aktiv ist. Die Menge des gebildeten Formazans korreliert mit der Anzahl lebender Zellen in der Meßprobe.

Ergebnis

L428 Zellen (CD30⁺) stellen in Abhängigkeit von der Konzentration antisense Oligonukleotid 1 und 2 ihre Proliferation ein und sterben. Bei Inkubationen mit dem sense-Oligonukleotid 1 und dem non-sense Oligonukleotid ist keine signifikante Änderung der Zellproliferation zu beobachten (Abb. 3a).

BL60 Zellen (CD30⁻) zeigen keine Änderung der Zellproliferation in Gegenwart der CD30 anti-sense Oligonukleotide 1 und 2 oder in Gegenwart der Kontroll-Oligonukleotide (Abb. 3b).

Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß die Proliferation CD30⁺ Tumor-Zellen in Gegenwart von Oligonukleotiden, deren Sequenz homolog zu der CD30 spezifischen mRNA Sequenz ist, inhibiert wird und die Zellen anschließend dem Zelltod unterliegen.

Patentansprüche

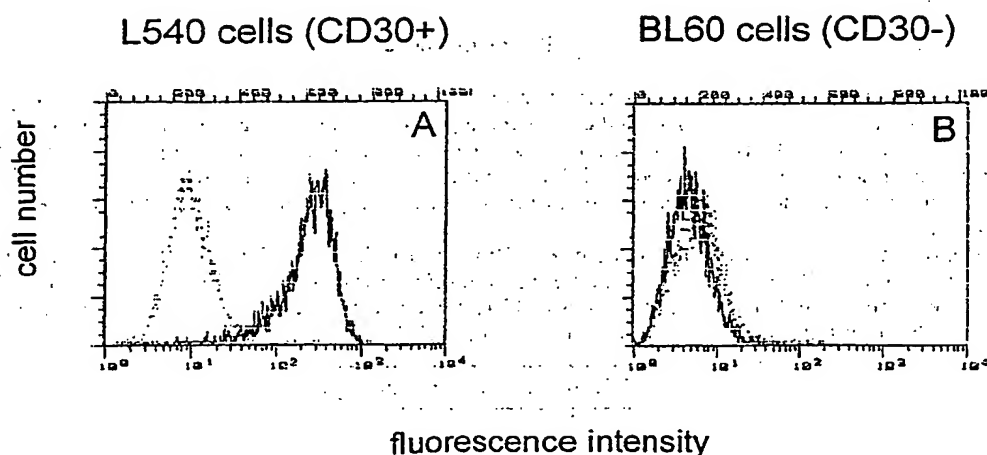
1. Verfahren zur Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30 Antigen exprimierenden Zellen, umfassend die Verwendung eines Moleküls, das spezifisch an das CD30 Antigen bindet, ohne eine zelluläre Aktivierung durch das CD30 Antigen auszulösen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure oder deren Derivat verwendet wird, die an die CD30 spezifische RNS bindet.
2. Nukleinsäuren oder deren Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie an die CD30 spezifische RNS binden.
3. Verfahren zur Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30 Antigen exprimierenden Zellen, umfassend die Verwendung eines Moleküls, das spezifisch an das CD30 Antigen bindet, ohne eine zelluläre Aktivierung durch das CD30 Antigen auszulösen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Inhibitor der CD30 vermittelten Signaltransduktion verwendet wird.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

FACS-Analyse von L540 Hodgkin's Lymphom Zellen (CD30⁺) (A) und BL60 Burkitt's Lymphom-Zellen (CD30⁻) (B) mit Hilfe der CD30-Antigen bindenden Domäne SEQ ID NO 1.

Die Zellen wurden wie im Beispiel 1 beschrieben mit dem Phagen M13-SEQ ID NO 1 inkubiert und die Bindung mit Hilfe eines Schaf anti-M13 Antikörpers und eines FITC-anti-Schaf Antikörpers nachgewiesen [----]. Als Kontrollen dienten Inkubationen ohne M13-SEQ ID NO 1 [.....].



BEST AVAILABLE COPY

Abb. 2

Spezifische Zytolyse CD30⁺ L540 Lymphomzellen (A), nicht aber von CD30⁻ BL60 Lymphom-Zellen (B) durch F8 und C1 Zellen mit der anti-CD30 Domäne SEQ ID NO 1.

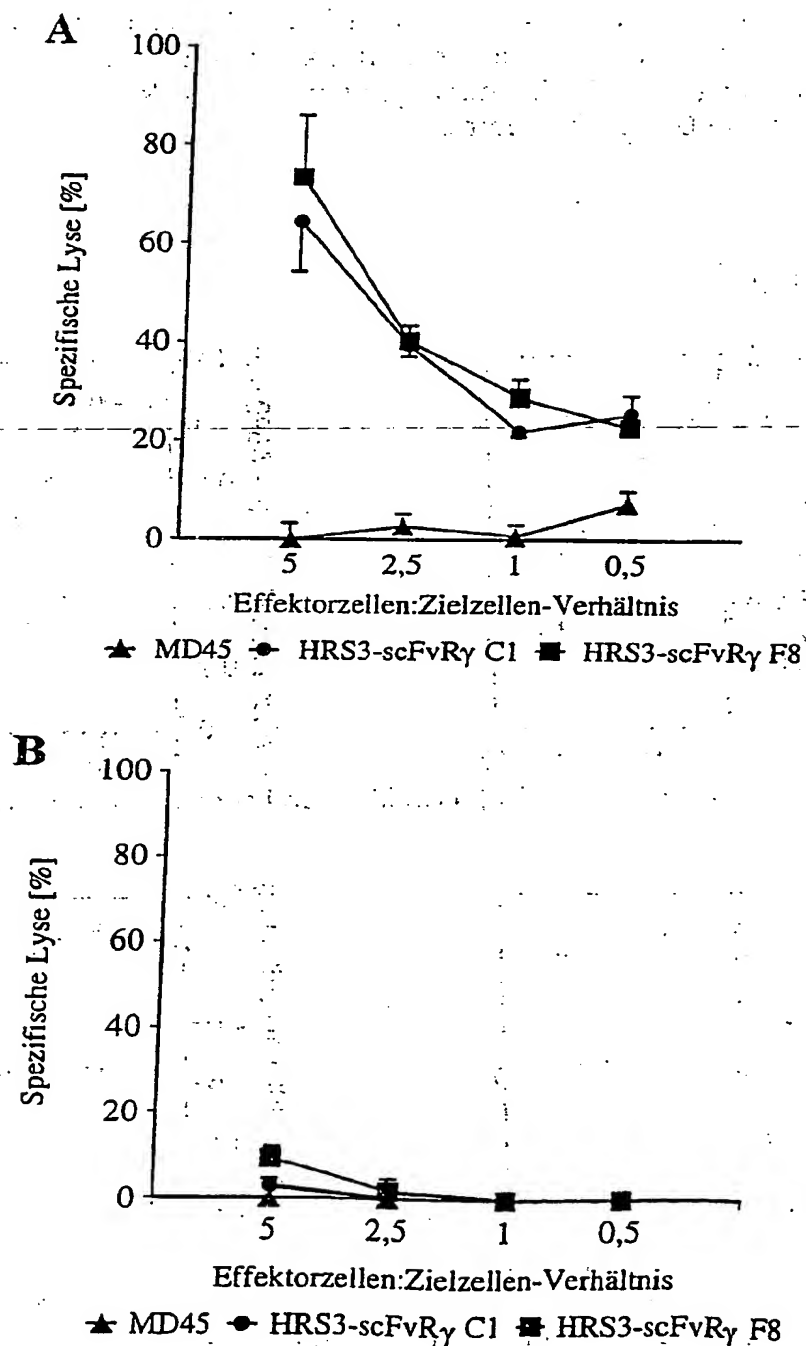
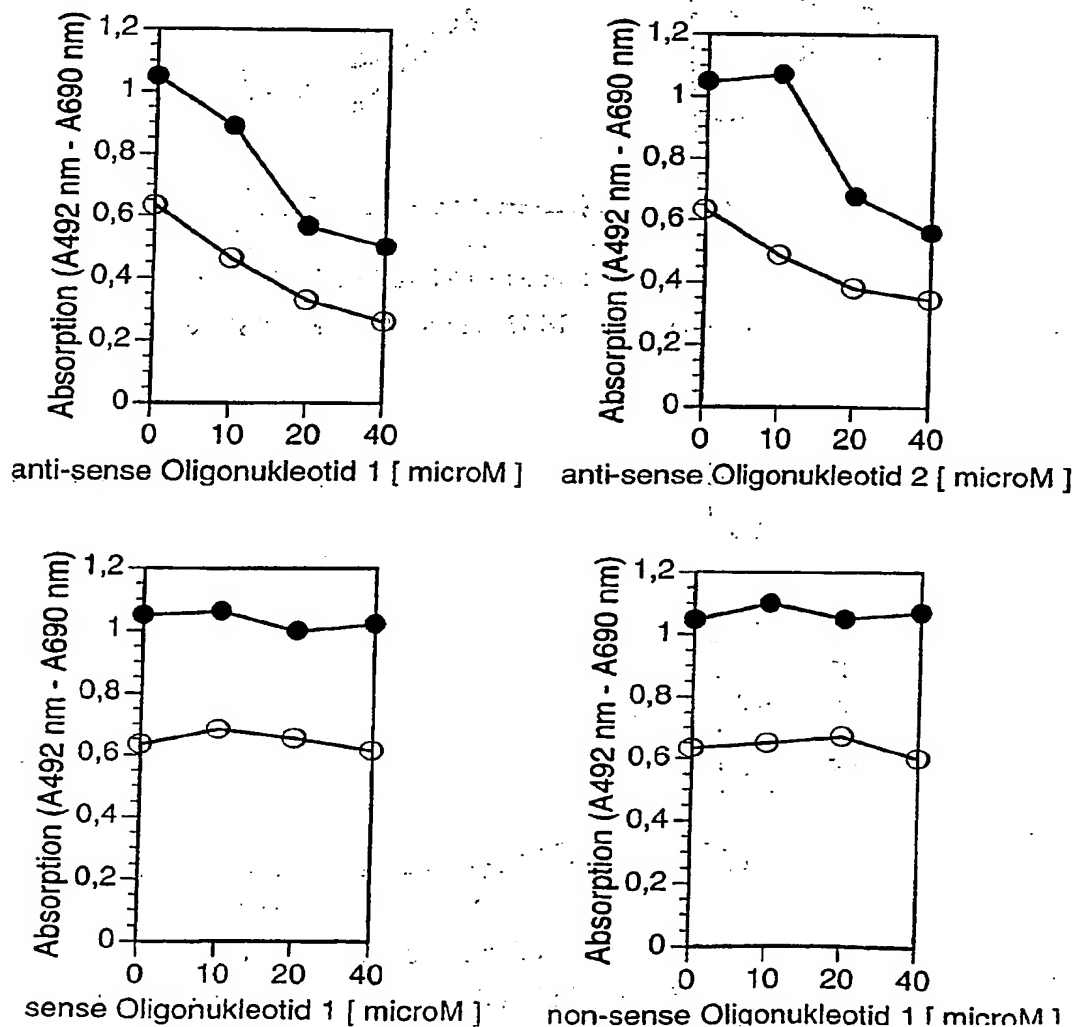


Abb. 3 a,b

XTT-Metabolisierung von L428 (CD30⁺) und BL60 (CD30⁻)Lymphomzellen in Gegenwart von CD30 RNS bindenden
Oligonukleotiden.

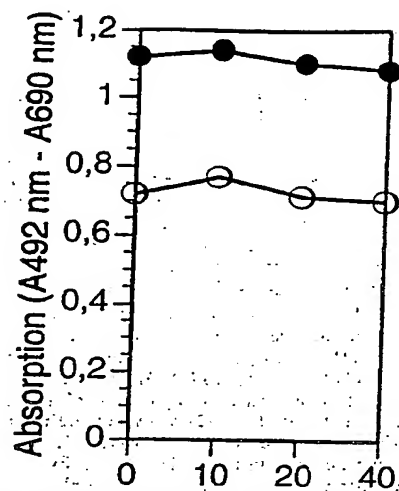
Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^3 Zellen/100 μ l [---] und 5×10^2 Zellen/100 μ l [-o-] Kulturmedium ausgesät und in Gegenwart der Oligonukleotide (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M) inkubiert. Am Tag 5 der Inkubation wurde die Zellvitalität mit Hilfe der Metabolisierung von XTT durch photometrische Messung der Absorption bei 495 nm/690 nm bestimmt.

a. L428 Zellen

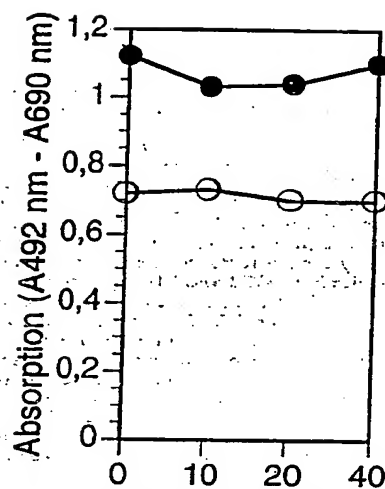


BEST AVAILABLE COPY

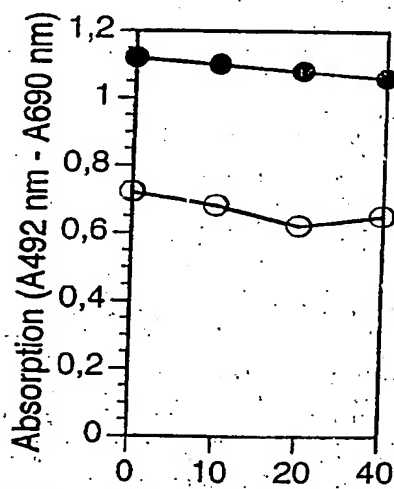
b. BL60 Zellen



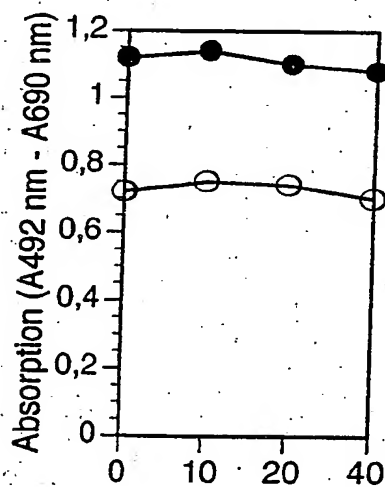
anti-sense Oligonukleotid 1 [microM]



anti-sense Oligonukleotid 2 [microM]



sense Oligonukleotid 1 [microM]



non-sense Oligonukleotid 1 [microM]